Arthrobacter sp. 2PR 降解 2-羟基吡啶动力学及降解特性研究*

胡春辉[1,2] 徐青[1] 于浩[1**]

(1 青岛农业大学 生命科学学院 青岛 266109)

(2 中国海洋大学 环境科学与工程学院 青岛 266100)

摘 要：从辽河口石油污染土壤中筛选到一株能够以 2-羟基吡啶作为唯一碳源、氮源和能源进行生长的菌株 2PR，基于形态学观察、16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株 2PR 属于节杆菌属（*Arthrobacter*）。菌株 2PR 生长和降解 2-羟基吡啶的最适条件是 30℃，pH 为 7.0。当 2-羟基吡啶初始浓度为 6.0 mg/mL 时，120 h 菌株 2PR 对 2-羟基吡啶的降解效率为 94.48%，初始 2-羟基吡啶浓度为 8.0 mg/mL 时，156 h 的降解效率为 89.21%。对 2-羟基吡啶降解动力学过程进行模拟，结果显示菌株 2PR 生长和降解过程符合 logisitic 模型，该模型为环境中 2-羟基吡啶的生物降解提供了理论参考。休止细胞反应和中间代谢产物检测表明，菌株 2PR 在降解 2-羟基吡啶的过程中生成了蓝色化合物 4,5,4′,5′-tetrahydroxy-3,3′-diazadiphenoquinone-(2,2′)。推测该菌株降解 2-羟基吡啶的途径可能是首先由双加氧酶催化生成 2,3,6-三羟基吡啶，后者会自发形成蓝色中间代谢产物，2,3,6-三羟基吡啶发生开环反应，最终被完全降解。菌株 2PR 是已报道菌株中 2-羟基吡啶耐受能力和降解能力最强的菌株，在污染物生物修复方面具有广阔的应用前景。

关键词：2-羟基吡啶；微生物降解；动力学；节杆菌 2PR

Characteristics and kinetic study of 2-hydroxypyridine degradation by a novel bacterium *Arthrobacter* sp. 2PR*

HU Chun-Hui[1,2] XU Qing[1] YU Hao[1**]

(1 College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2 College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract: A novel strain, which could use 2-hydroxypyridine (2HP) as the sole source of carbon, nitrogen, and energy, was isolated from ~~the~~ petroleum-contaminated soil at the Liaohe estuarine wetland. Strain 2PR was identified as *Arthrobacter* based on the morphology and 16S rRNA gene sequence. The optimum growth and degradation condition upon 2PR is 30℃ and pH 7.0, respectively. Under this condition, 2HP degradation rate were 97.34%, 94.95%, 94.48% and 89.21% with 2, 4, 6 and 8 mg/mL initial concentration of 2HP at 42, 96, 120 and 156 h, respectively. Strain growth and 2HP degradation kinetics studies indicated that the strain followed

*国家自然科学基金项目（31600086）、山东省自然科学基金青年基金项目（ZR2016CQ06）资助项目

**通讯作者，Tel：86-532-86080543；电子信箱：yuhaosunshine@163.com

Logisitic model, which could provide a theoretical and technical reference for the biodegradation of 2HP. The color of strain 2PR culture upon 2HP-MSN changed from colorless to blue, and then turned to brown. The blue pigment, which was observed at the culture of strain 2PR, was identified as 4,5,4′,5′-tetrahydroxy-3,3′-diazadiphenoquinone-(2,2′) by high performance liquid chromatography (HPLC) and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. The LC-MS signal with *m/z*=249.1 was observed in resting cells reaction sample with 2HP as the substrate. The degradation of 2HP might be achieved by a dioxygenase to produce 2,3,6-trihydroxypyridine, which could transformed to the blue pigment spontaneously, and then 2,3,6-trihydroxypyridine was converted with an pyridine-ring cleavage reaction. Among all the reported strains, strain 2PR has the strongest tolerance and the highest 2HP degradation efficiency at present. The strain has a promising application potential for 2HP waste treatment.

Key words: 2-hydroxypyridine; biodegradation; kinetics; *Arthrobacter* sp.2PR

吡啶及其衍生物是一类常见的氮杂环有机污染物，主要来自于石油冶炼，药物、杀虫剂、除草剂的有机合成等过程[1]。吡啶类污染物具有较高的生物学毒性，由于氮原子的存在，使得吡啶类化合物催化特异性强，因此一定程度上吡啶环降解相对于芳香环更加复杂[2]。环境中吡啶类化合物代谢微生物数量远远小于芳香族污染物代谢微生物的数目。羟基吡啶是吡啶类污染物中的重要的一类，也是微生物降解吡啶类化合物的核心中间代谢产物[3]。吡啶氮氧化物、尼古丁、吡啶羧酸、吡啶等吡啶类化合物代谢过程中均会产生羟基吡啶类中间代谢产物。因此羟基吡啶类化合物的微生物代谢研究对于吡啶类污染物的生物修复研究具有十分重要的意义[1]。

2-羟基吡啶（2HP）是羟基吡啶污染物的一种，降解菌株在自然界中分布很多。从上世纪 70 年代就开始有研究者研究 2-羟基吡啶降解菌株[4, 5]。研究者陆续分离得到了多株能够以 2-羟基吡啶作为唯一碳氮源进行生长的菌株，它们分别属于 *Arthrobacter*[6, 7]、*Rhodococcus*[8]、*Achromobacter*[9]、*Nocardia*[10]等属。同时研究者对分离到的菌株的代谢产物进行了研究，大部分菌株在代谢 2-羟基吡啶的过程中会产生一种蓝色物质，据文献报道这种蓝色物质为 4,5,4′,5′,-tetrahydroxy-3,3′,-diazadiphenoquinone-(2,2′) (blue pigment)，是由 2,3,6-三羟基吡啶自动氧化生成[11]。这表明大部分菌株是通过在吡啶环上进行单加氧或者双加氧反应生成 2,3,6-三羟基吡啶再进行后续降解的。这一点与酶学研究结果一致，有报道表明 2-羟基吡啶的第一阶段的反应涉及 NADH 依赖的黄素（FMN）氧化还原酶[3]。在菌株 *Achromobacter* sp.中[9]2-羟基吡啶和 3-羟基吡啶首先转化为 2,5-二羟基吡啶，随后吡啶环发生双加氧反应，断裂生成马来酰胺酸、马来酸，并最终生成富马酸进入三羧酸循环，完成整个降解过程[12]。这些都表明微生物对 2-羟基吡啶的代谢具有多样性，但是完整的 2-羟基吡啶的代谢途径并没有报道。关于微生物对 2-羟基吡啶的降解效率和降解动力学的研究到目前也未见相关报道。

微生物代谢 2-羟基吡啶分子机理研究较少，有研究表明部分菌株的 2-羟基吡啶降解基因位于质粒上面，如菌株 *Arthrobacter crystallopoietes*，该菌株经过传

代后会丧失降解 2HP 的能力[7]。大部分菌株的降解基因位于基因组上，如菌株 *A.pyridinolis* 和 *A.viridescens*[6]。菌株 *Rhodococcus rhodochrous* PY11 降解 2-羟基吡啶的分子机理研究的比较清楚，该菌株中 2-羟基吡啶首先经由一个四组分的双加氧酶（HpoBCDF）氧化为 3,6-dihydroxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin-2-one，进一步由 HpoE 氧化成 2,3,6-trihydroxypyridine 三羟基吡啶，三羟基吡啶被 HpoH 进一步转化为 2-酮戊二酸单酰胺，2-酮戊二酸单酰胺被 HpoI 转化为α-酮戊二酸进入三羧酸循环[8]。但是相关酶的酶学性质还没有具体研究，另外节杆菌降解 2-羟基吡啶的分子机理尚不清楚。

本研究筛选到一株能够高效降解 2-羟基吡啶的菌株 *Arthrobacter* sp. 2PR，对其降解特性和降解动力学进行了研究。菌株 2PR 对底物的耐受能力强，在 2-羟基吡啶浓度为 8 mg/mL 下仍然能够正常生长，并且 2-羟基吡啶降解效率接近 90%。本研究详细研究了菌株 2PR 在不同 2-羟基吡啶浓度下生长和降解过程，并建立了菌株生长和降解动力学模型。利用 HPLC 和 LC-MS 等手段对其中间代谢产物进行检测，推测菌株 2PR 首先将 2-羟基吡啶氧化生成 2,3,6-三羟基吡啶，后者自动生成4,5,4′,5′-tetrahydroxy-3,3′-diazadiphenoquinone-(2,2′)使得培养物产生蓝色；生成的 2,3,6-三羟基吡啶发生吡啶环开环反应最终被逐步降解进入三羧酸循环。菌株 2PR 能够在在较短的时间内将高浓度的 2-羟基吡啶完全降解，表明该菌株在生物修复 2-羟基吡啶污染物方面具有潜在应用价值。

1 材料与方法

1.1 样品和培养基

辽河口湿地石油污染土壤；

无机盐（MSM）培养基（去离子水 1 000 mL）：12.6 g $K_2HPO_4{\bullet}3H_2O$，3.4 g KH_2PO_4，1.0 g Na_2SO_4，0.2g $MgSO_4{\bullet}7H_2O$，微量金属盐溶液 1 mL；pH 7.0，121^oC 灭菌 20 min。金属盐溶液（去离子水 1 000 mL）：0.05 g $CaCl_2{\bullet}2H_2O$，0.05 g $CuCl_2{\bullet}2H_2O$，0.008 g $MnSO_4{\bullet}H_2O$，0.04 g $FeSO_4{\bullet}7H_2O$，0.05 g $ZnSO_4$，0.1 g $Na_2MoO_4{\bullet}2H_2O$，0.05 g $Na_2WO_4{\bullet}2H_2O$，0.038 g $CoCl_2{\bullet}6H_2O$，0.02 g $MnCl_2{\bullet}4H_2O$，0.0124 g H_3BO_3。

富集培养基：无机盐培养基中加入 1 mg/mL 的 2-羟基吡啶、0.5 g/L 酵母粉和 0.5 g/L 蛋白胨，121^oC 高压蒸汽灭菌 20 min。

2-羟基吡啶无机盐（MSM-2HP）液体培养基：MSM 无机盐培养基中加入 1 mg/mL 的 2-羟基吡啶，121^oC 高压蒸汽灭菌 20 min。

MSM-2HP 固体培养基：MSM-2HP 液体培养基中加入 1.5%琼脂粉。

1.2 主要试剂

2-羟基吡啶（上海阿拉丁生化科技股份有限公司），基因组提取试剂盒（生工生物工程（上海）股份有限公司）；2×Pfu Mix（天根生物科技有限公司），甲醇（上海安谱实验科技股份有限公司）。

1.3 主要仪器

超净工作台（SW-CJ-2FD，苏州净化设备有限公司）；恒温摇床（QYC 2112，上海福玛实验设备有限公司）；PCR 仪（T100 Thermal Cycler，Bio-Rad）；离心机（GTR 22-1，北京时代北利离心机有限公司）；紫外分光光度计（UV2310 II，上海天美公司）；立式压力蒸汽灭菌锅（MLS-3750，SANYO）；HPLC（Agilent 1100，美国 Agilent 公司）；LC-MS（1290 Infinity /6460 UHPLC /MS/MS，美国 Agilent 公司）。

1.4 菌株 2PR 的 16S rRNA 基因序列分析

用基因组提取试剂盒提取菌株 2PR 的全基因组，以其为模板，采用通用引物 27F （ 5′-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3′ ） 和 1492R（5′-GGTTACCTTGTTACGATC-3′），扩增菌株的 16S rRNA 基因序列扩增。 PCR 反应体系：基因组 DNA 为模板 1 μL， 2×Pfu Mix 12.5 μL，引物 27F 1 μL，引物 1492 R 1 μL，用超纯水补足至 25 μL。PCR 反应条件：94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 1 min， 55℃ 退火 1 min， 72℃ 延伸 2 min，共 30 个循环；最后 72℃ 延伸 5 min， 4℃保温。

将 PCR 产物送至擎科新业生物技术有限公司进行测序。将获得的序列与其他模式微生物的 16S rRNA 基因序列利用 MEGA 6.0 软件 Neighbour-Joining 法构建系统发育进化树[13]。

1.5 菌株 2PR 生长条件优化

菌株生长最适 pH 测定：分别配制不同 pH 值 （5.0、6.0、7.0、8.0、9.0）的 MSM-2HP 培养基，按照 1% 的接种量，置于 30℃，180 r/min 恒温振荡培养箱中培养，每隔 6 h 取培养物 1 mL， 9 000 r/min 离心 1 min；将沉淀用 1 mL 蒸馏水重悬，测定 600 nm 处的吸光值（$OD_{600\ nm}$），以确定菌株 *Arthrobacter* sp. 2PR 生长的最适 pH 值，每组试验做 3 个重复。

菌株生长最适温度测定：选取最适 pH 值条件，按照 1% 的接种量，将其置于 25℃、30℃、35℃和 40℃恒温振荡培养箱（180 r/min）中培养，每隔 6 h 取样，测定 $OD_{600\ nm}$ 值，确定菌株 *Arthrobacter* sp. 2PR 生长的最适温度，每组试验做 3 个重复。

1.6 菌株 2PR 降解 2-羟基吡啶特性研究

将 *Arthrobacter* sp. 2PR 接种到 MSM-2HP 培养基中培养至对数后期， 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，用 PBS 缓冲液重悬并洗涤菌体两次，最终菌体用 PBS 缓冲液重悬至 OD_{600nm} 为 6.0，作为休止细胞。加入终浓度为 2 mg/mL 的 2-羟基吡啶，在 30℃ 120 r/min 下进行反应，每隔 2 h 取样，用紫外可见光扫描 200 nm-400 nm 范围内的吸光值，研究菌株 *Arthrobacter* sp. 2PR 对 2-羟基吡啶的降解情况。

1.7 菌株 2PR 降解 2-羟基吡啶动力学分析

按照 1%的接种量将菌株 2PR 接种到不同浓度（0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、3.0、4.0、6.0 和 8.0 mg/mL）的 MSM-2HP 培养基中， 30℃ 180 r/min 振荡培养，每 12 h 取样测定菌株 $OD_{600\ nm}$ 值和 2-羟基吡啶的浓度，构建菌株 2PR 降解 2-

羟基吡啶的动力学模型，每组试验做 3 个重复。利用 Origin 8.0 软件对菌株的生长动力学和底物降解动力学进行模拟。

1.8 2-羟基吡啶测定方法

高效液相色谱仪（HPLC）检测法：色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 反相柱（5 μm×4.6 mm×250 mm），流动相为 10% 甲醇和 90% 1 mM H_2SO_4，进样量为 2 μL，柱温 30℃，流速为 1 mL/min，检测器为 DAD 检测器，检测波长范围为 200 nm-400 nm。

紫外分光光度计检测法：用紫外可见光扫描 200 nm-400 nm 范围内的吸光值。HPLC 结果表明 2-羟基吡啶在 340 nm 处有特征吸收峰，且峰值大小跟 2-羟基吡啶的含量存在正相关，因此可以用 340 nm 处的吸光值变化表征 2-羟基吡啶浓度的变化。

1.9 菌株 2PR 降解 2-羟基吡啶代谢中间化合物检测

利用安捷伦高效液相色谱仪。样品处理方法：将步骤 1.6 中取得的样品，加入 2 倍体积甲醇，4℃静置 10 min，10 000 r/min 离心 2 min，取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤后上机检测。

用高效液相色谱-质谱（LC-MS）对底物和产物进行分析。色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 反相柱（5 μm×4.6 mm×250 mm），检测器为 PDA，离子源为 EIS。用水相的 C18 柱对样品进行分离，柱温为 40℃，流动相 A 为超纯水，流动相 B 为甲醇溶液，流速为 0.3 mL/min。洗脱程序如下：0 min 到 1 min 为 15% 流动相 B，1 min 到 4 min 为 100%流动相 B，4 min 到 6 min 为 100%流动相 B，6 min 到 6.01 min 为 15%流动相 B，6.01 min 到 8 min 为 15%流动相 B。质谱扫描范围为 m/z 从 50-500，氮气为雾化和干燥气体，分别收集阳离子模式和阴离子模式下的质谱信号。收集到的数据用 Qualitative Analysis 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 2PR 鉴定与形态学观察

将菌株 2PR 在 MSM-2HP 固体培养基上进行划线，观察菌落形态为白色、圆形、边缘规则、湿润呈半透明状。菌株 *Arthrobacter* sp. 2PR 经碘液染色后用油镜观察不同生长时期均为短杆状。扫描电镜结果显示菌株为短杆状，长约为 0.5 μm-1 μm，直径约为 0.4 μm-0.6 μm，呈圆柱形且末端有辐射状花纹。

将菌株 2PR 的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI（菌株 2PR 的序列注册号为 KY203652）上进行 BLAST 比对，结果表明该菌株跟节杆菌属的亲缘关系最近。与 *Arthrobacter globiformis* 的序列相似性最高，在 99%以上。综上所述，菌株 2PR 属于节杆菌属，将其命名为 *Arthrobacter* sp. 2PR。

菌株 2-PR 能够以 2-羟基吡啶为唯一碳源、氮源和能源进行生长，不能够利用 4-羟基吡啶、烟酰胺、烟酸、2-氨基吡啶、2,3-二羟基吡啶、2-吡啶甲酸、2,4-二羟基吡啶、2,5-二羟基吡啶、2,6-二羟基吡啶等吡啶类化合物作为底物进行生长。

2.2 节杆菌 2PR 生长条件优化

按照 1%接种量，初始 2-羟基吡啶浓度为 1 mg/mL，在不同 pH 的 MSM-2HP 培养基中培养菌株 2PR，观察菌株 2PR 在不同条件下的生长情况。图 1a 结果表明，节杆菌 2PR 在较宽的 pH 范围内都可以生长，在 pH 为 7 时菌株生长最好，其次是 pH 8 和 pH 6，因此选择 pH 7 的培养基进行后续试验。

培养基 pH 值为 7，分别将菌株 2PR 放置于不同温度 18℃、24℃、30℃、37℃和 42℃的恒温振荡培养箱中培养，转速为 180 r/min，研究温度对菌株 2PR 生长情况的影响。如图 1b 所示，在 30℃和 37℃下菌株 2PR 生长速率最快，生长曲线基本重合。在 18℃和 23℃下生长较慢，但是也可以达到最大生长量，在 42℃菌株生长十分微弱，本研究中选择 30℃作为后续试验的培养温度。

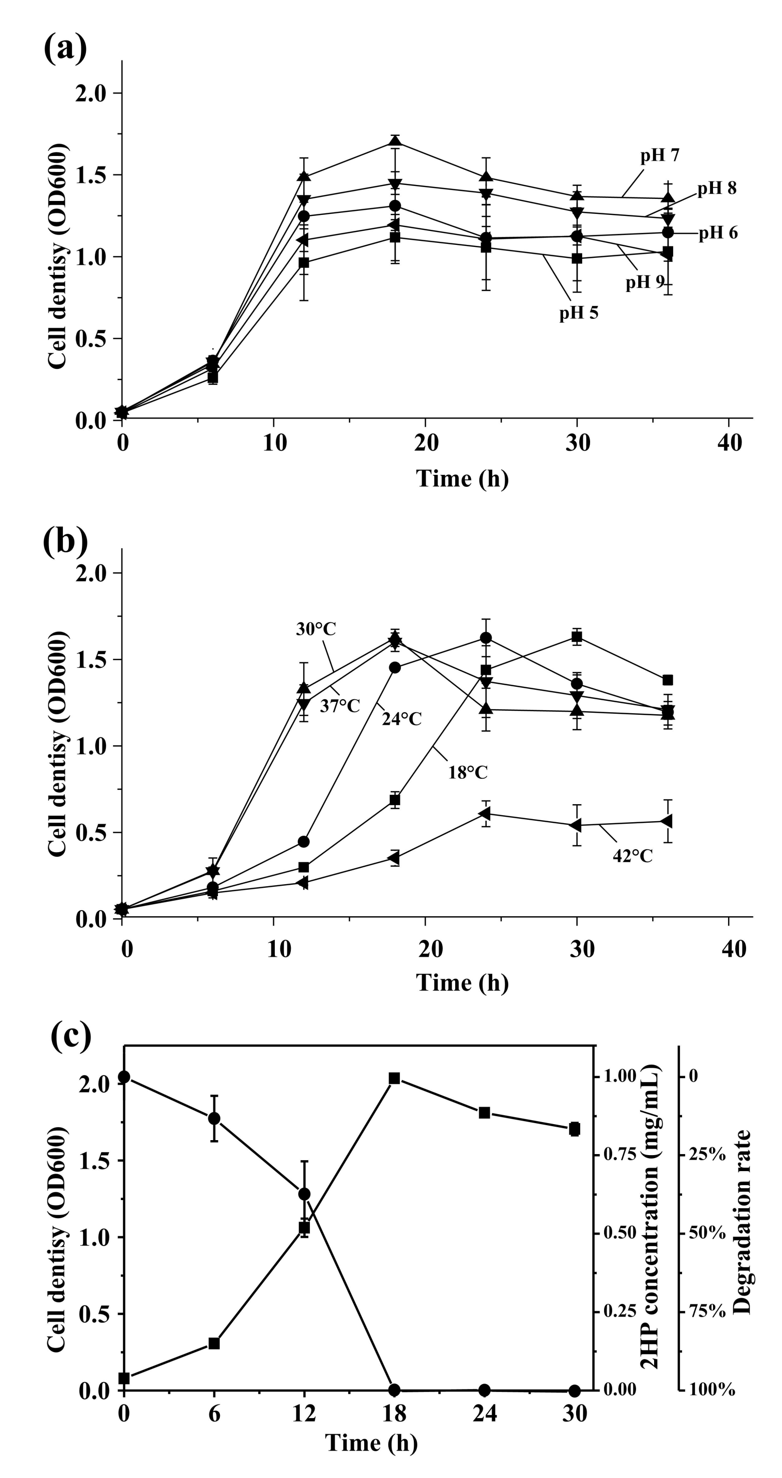


图 1 pH（a）和温度（b）对 *Arthrobacter* sp. 2PR 生长的影响以及在最适生长条件下的生长曲线和 2HP 降解曲线（c）

Fig.1 Effect of pH (a) and temperature (b) on growth, and degradation curves (c) of *Arthrobacter* sp. 2PR under optimum growth conditions

在最优生长条件下，将节杆菌 2PR 按照 1%接种量接种至 MSM-2HP 培养基，测定菌株 2PR 的生长量和 2-羟基吡啶的降解效率。如图 1c 所示，2-羟基吡啶随着菌体的生长被逐渐降解，在培养 18 h 时，菌体浓度达到最大值，同时培养基

中 2-羟基吡啶被完全降解，降解效率达到 100%。

2.3 菌株 2PR 降解 2-羟基 吡啶动力学分析

为研究菌株 2PR 对于底物 2-羟基吡啶的降解动力学，将菌株 2PR 接种至不同 2-羟基吡啶浓度（0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 mg/mL）的 MSM-2HP 培养基中，将接种后的菌株置于 30℃，180 r/min 振荡培养，每隔一段时间取样测定菌株浓度和 2-羟基吡啶浓度。

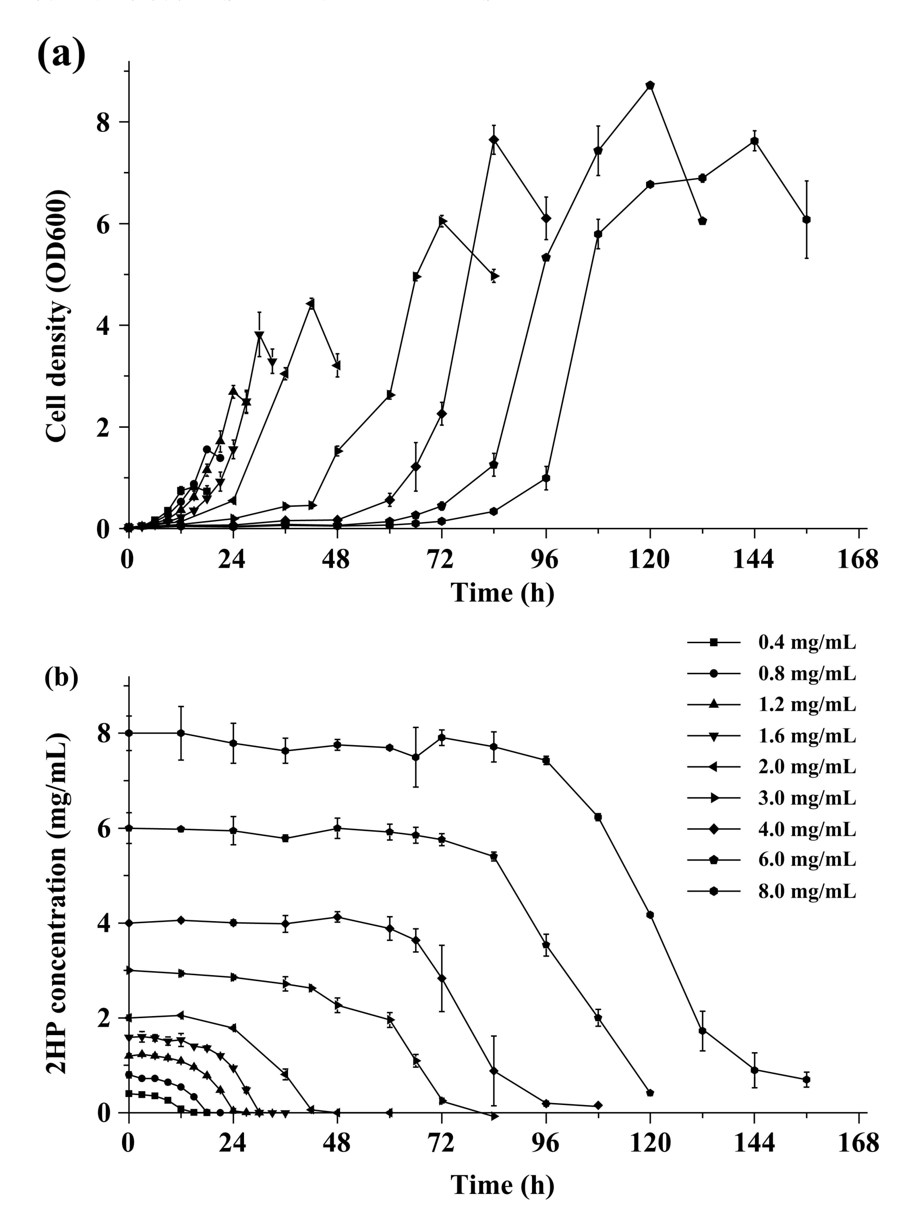


图 2 *Arthrobacter* sp. 2PR 在不同初始 2HP 浓度的 MSM-2HP 培养基中的生长曲线（a）和降解曲线（b）

Fig. 2 Growth (a) and biodegradation curve (b) of strain *Arthrobacter* sp. 2PR under different 2HP concentration (0.4 mg/mL- 8.0 mg/mL)

如图 2a 所示，菌株 2PR 在 2-羟基吡啶浓度从 0.4 mg/mL-8.0 mg/mL 的无机盐培养基中均能较好的生长。一定范围之内 2-羟基吡啶的浓度越高，细菌所能达到的最大生长浓度越高。菌株 2PR 在 2-羟基吡啶浓度为 6.0 mg/mL 的无机盐培

养基中培养 120 h 后，$OD_{600\ nm}$ 值达到最高 8.77。同时随着 2-羟基吡啶浓度生长，细菌生长的延迟期越长，当 2-羟基吡啶浓度为 8.0 mg/mL 时，菌株最高生长浓度为 $OD_{600\ nm}$=7.77，小于 6.0 mg/mL 时。这说明了 2-羟基吡啶对菌株 2PR 具有一定的生物学毒性，菌株需要经过一段时间适应才能利用 2-羟基吡啶进行生长并对其进行降解。

描述微生物在限制条件下生长的模型主要是 Mond 方程和 Logistic 方程[14]，这两个方程均不能适用于分析延迟期较长的菌体生长情况[15]，从图 2 可以看出，菌株 2PR 在 MSM-2HP 培养基中培养时延迟期较长，且随着底物浓度的提高，延迟期不断延长。在分析菌株生长动力学时，将延迟期的数据剔除，生长期和稳定期生长和降解的数据均符合 Logistic 方程（式中相关性参数值见表 1）：

$$y = A2 + \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x0}\right)^{P}}$$

表 1 菌株 2PR 生长和降解的 Logistic 模型参数及拟合度

Table 1 Parameters and R^2 of Logistic model

Initial 2HP concentration /(mg/mL)	Lag time/h	Growth Parameters					Degradation Parameters				
		A1	A2	X0	P	R^2	A1	A2	X0	P	R^2
1	0	0.01	1.82	12.61	29.13	0.95	48.65	2.04	14.71	8.43	1.00
2	0	0.23	4.11	35.70	115.05	0.90	89.65	1.91	35.6	30.59	0.99
3	12	0.33	5.35	65.48	18.79	0.96	127.19	-6.71	70.50	11.34	0.98
4	48	0.43	6.00	73.17	41.27	0.88	184.47	3.39	77.54	14.45	1.00
6	66	0.37	7.46	92.18	22.27	0.90	287.00	-89.03	107.91	8.68	0.99
8	84	0.23	6.86	102.45	31.3	0.97	365.71	29.09	120.88	15.79	0.99

菌株 2PR 在不同浓度 2-羟基吡啶的降解效率如图 3 所示。在 2-羟基吡啶浓度为 1 mg/mL 时，在 24 h 降解效率为 100%；在 2-羟基吡啶浓度为 2 mg/mL 时，在 42 h 降解效率为 97.34%；在 2-羟基吡啶浓度为 3 mg/mL 时，在 84 h 降解效率为 96.75%；在 2-羟基吡啶浓度为 4 mg/mL 时，在 96 h 降解效率为 94.95%；在 2-羟基吡啶浓度为 6 mg/mL 时，在 120 h 降解效率为 94.48%；在 2-羟基吡啶浓度为 8 mg/mL 时，在 156 h 降解效率为 89.21%。随着底物浓度的提高，菌株 2PR 对 2-羟基吡啶的降解效率没有下降。显示出了菌株 2PR 对 2-羟基吡啶强大的耐受能力和降解能力，表明该菌株在 2-羟基吡啶污染生物修复应用方面具有较大潜力。

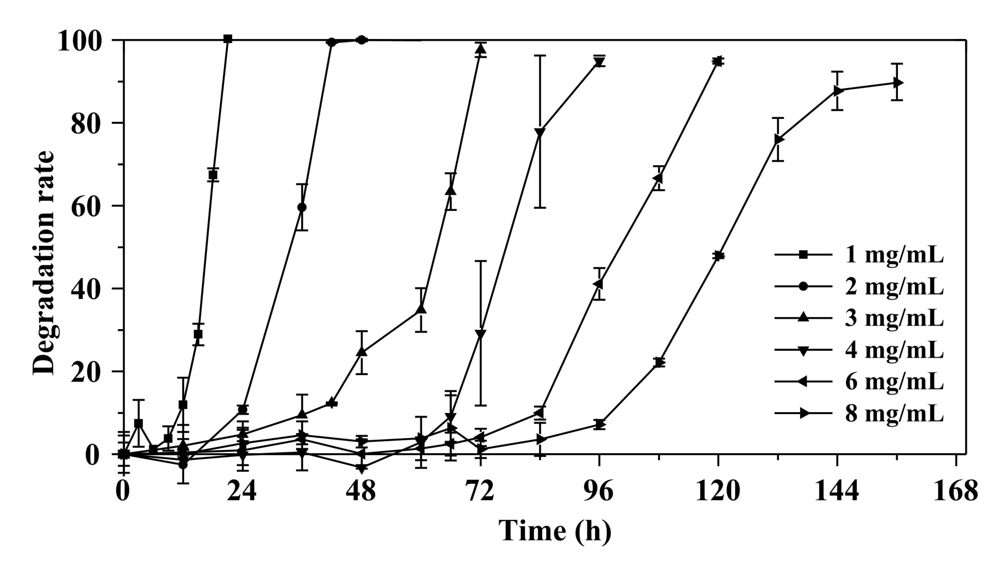


图 3 不同浓度 2HP 下 *Arthrobacter* sp. 2PR 的降解效率

Fig. 3 Degradation efficiency of *Arthrobacter* sp. 2PR under different concentrations of 2HP

2.4 菌株 2PR 降解 2-羟基吡啶中间代谢产物分析

利用 MSM-2HP 培养基培养菌株 2PR，培养物的颜色随时间不同依次呈现淡紫色、蓝紫色和棕黄色（如图 4 所示），这表明 2-羟基吡啶在代谢过程中产生了其他的吡啶类中间代谢产物。该蓝色物质在吡啶类化合物代谢中十分常见，推测该蓝色中间代谢产物可能是 4,5,4′,5′-tetrahydroxy-3,3′-diazadiphenoquinone-(2,2′)[11]。



图 4 菌株 2PR 在 MSM-2HP 培养基中随时间产生不同颜色变化

Fig. 4 The colour of strain 2PR culture changed at different time in MSM-2HP medium

利用菌株 2PR 的休止细胞对 2HP 进行降解，每隔 2 h 取样进行紫外全波长扫描，结果如图 5a 所示，0 h 的样品在 220 nm 和 295 nm 处有吸收峰，随着反应时间的延长，这两个吸收峰的峰值不断变小，这表明 2HP 被不断降解。但是并没有其他新峰出现，这表明 2HP 第一步反应是开环反应或者最初反应生成的吡

啶环中间代谢产物迅速发生开环反应，因此从全波长扫描图谱中检测不到。

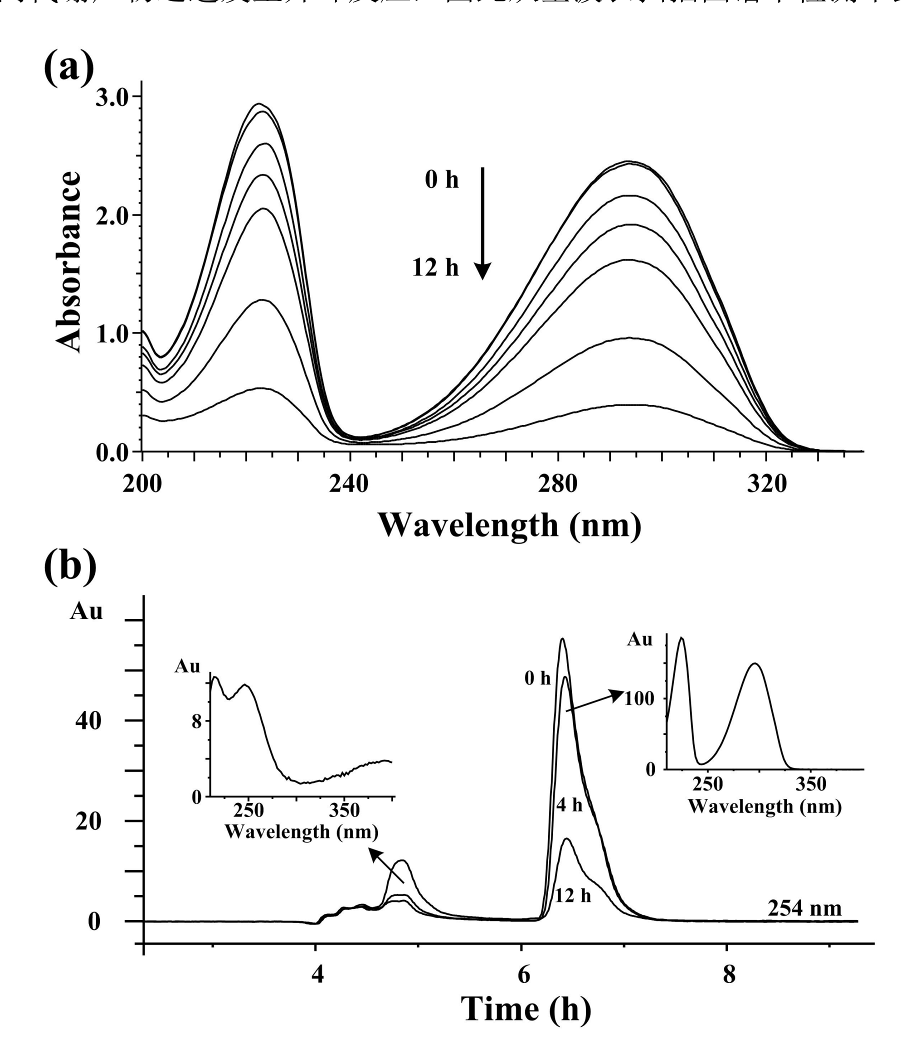


图 5 全波长扫描（a）和 HPLC（b）检测 2HP 降解休止细胞反应。全波长扫描图谱从上到下依此是 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h 取样样品，HPLC 检测 0 h、4 h、12 h 的样品

Fig. 5 UV absorption spectra (a) and HPLC (b) analysis of 2HP degraded by resting cells of *Arthrobacter* sp. 2PR

将休止细胞反应样品用 HPLC 分析底物变化和产物生成情况，0 h 样品在 6.5 min 左右有一个特征峰（图 5b），光谱信号显示该化合物在 220 nm 和 295 nm 处有特征吸收峰，与标准品相比较可以确定该峰为底物 2HP。休止细胞反应 4 h 和 12 h 样品的 HPLC 信号可以看出，底物 2-羟基吡啶的信号峰下降，在 4 min 55 s 出现一个新的吸收峰，光谱学信号显示该产物在 245 nm 处有一个特征吸收峰，另外在大于 400 nm 处有吸收峰，推测可能是 2-羟基吡啶降解的中间代谢产物。

将休止细胞反应 0 h 和 12 h 的样品利用 LC-MS 进行检测，结果（图 6）表明 0 h 的样品在阳离子模式下有信号峰（*m/z*=96.03），跟 2HP 标准品的保留时间和分子量一致确定该峰为底物 2HP；休止细胞反应 12 h 样品，在阳离子模式下仍有 *m/z*=96.03 的信号峰，另外在阴离子模式下出现一个新的信号峰（*m/z*=249）峰出现，结合培养基反应颜色变化、HPLC 光谱学信号可以确定该信号峰属于 4,5,4′,5′-tetrahydroxy-3,3′-diazadiphenoquinone-(2,2′)，该化合物是由 2,3,6-三羟基吡啶自动氧化生成。

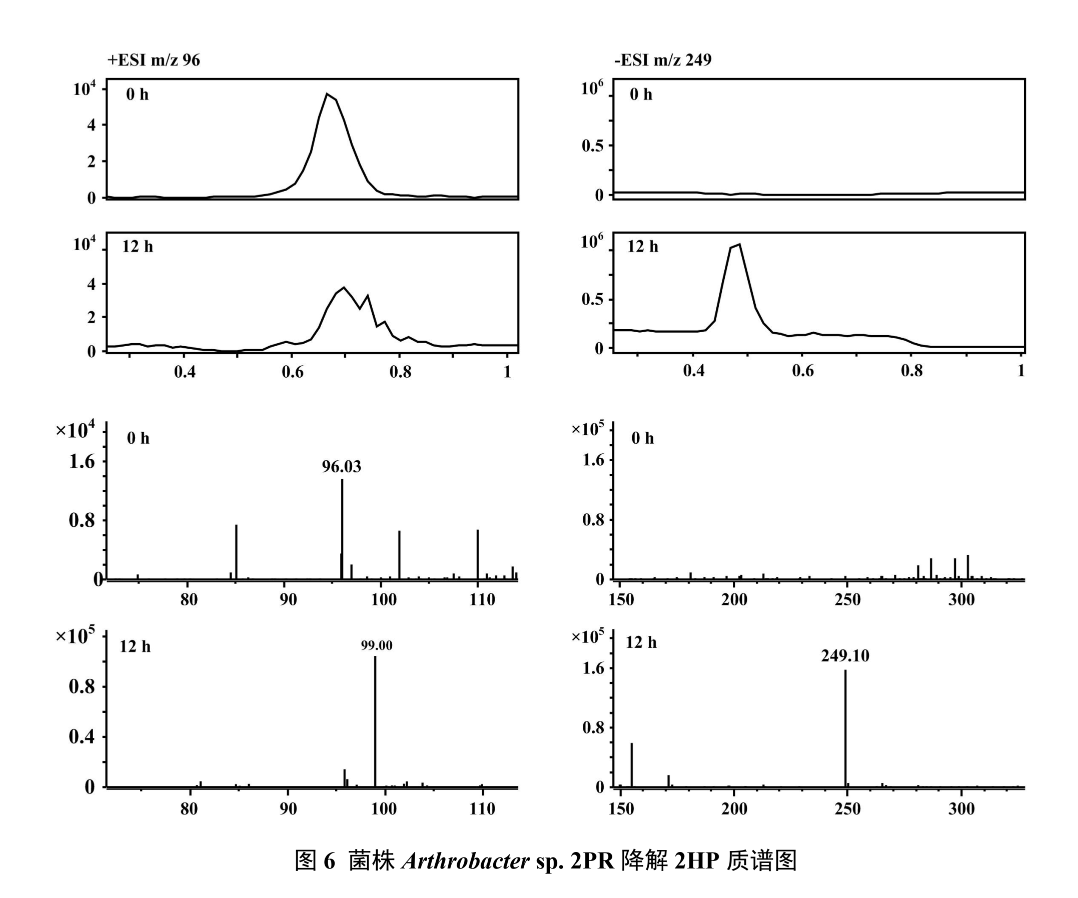


图 6 菌株 *Arthrobacter* sp. 2PR 降解 2HP 质谱图

Fig.6 LC-MS results of 2-hydroxypyridine degradation by *Arthrobacter* sp. 2PR

3 讨论

本研究从辽河口湿地石油污染土壤中筛选到一株能够以2-羟基吡啶为唯一碳源、氮源和能源进行生长的菌株，经形态学和16S rRNA基因进化分析表明该菌株属于节杆菌属，命名为*Arthrobacter* sp. 2PR。菌株2PR的最适生长温度为30℃和最适pH为7.0。菌株2PR对于2-羟基吡啶的耐受性很高，能够在高达8 mg/mL的2-羟基吡啶浓度下生长，并且降解效率接近90%。当浓度小于8 mg/mL的时候，菌株2PR对2-羟基吡啶的降解效率可以达到95%。在2-羟基吡啶浓度为0.4-8.0 mg/mL范围内菌株2PR的生长和降解过程均符合Logisitic模型。随着底物2-羟基吡啶浓度的升高，菌体生长的延迟期也随着增长，这可能是高浓度的2-羟基吡啶对细胞生长有一定的抑制作用，通过一段时间的适应细胞能够消除这种抑制作用，因此虽然菌体生长表现出一定时间的延迟但是降解效率并没有降低。

在MSM-2HP培养基中菌株2PR的培养物随着时间颜色不断变化，首先产生蓝色物质随后培养物变成棕色。通过HPLC和LC-MS可以确定该蓝色物质为4,5,4′,5′-tetrahydroxy-3,3′-diazadiphenoquinone-(2,2′)，推测是由2,3,6-三羟基吡啶自动氧化生成。催化2-羟基吡啶第一步反应的酶，在菌株*Arthrobacter* spp.中报道为单加氧酶[7]，在菌株*Achromobacter* sp. [9]和*Rhodococcus rhodochrous* PY11[8]中为双加氧酶。考虑到在休止细胞反应中并没有检测到其他吡啶环中间代谢产物，因此可以推测菌株2PR第一步催化的酶也是双加氧酶，经过该酶催化生成了2,3,6-

三羟基吡啶，经过进一步的开环反应，最终氧化成α-酮戊二酸进入三羧酸循环彻底降解[8]。Gasparaviciute等[16]筛选到的另外一株节杆菌菌株*Arthrobacter* sp. IN13能够同时利用4-羟基吡啶和2-羟基吡啶，但是诱导顺序对降解能力有很大影响，菌株*Arthrobacter* sp. IN13在2-羟基吡啶的培养基中培养后会丧失利用4-羟基吡啶的能力。而菌株2PR不能利用4-羟基吡啶，因此推测菌株2PR的吡啶化合物的降解基因与菌株IN13不同。菌株2PR降解2-羟基吡啶的分子机理还不清楚，需要后续实验继续研究。

随着人们对环境问题的关注，高效、温和处理环境中有机污染物研究具有重要意义。本研究分离获得了一株高效降解 2-羟基吡啶的菌株，该菌株是目前已报道降解 2-羟基吡啶能力最强的菌株，另外本研究对其降解动力学和降解特性进行了研究。这将为该类污染物的处理和污染环境修复提供理论基础。

致谢

本项目获得了青岛农业大学人才科研启动基金(No. 6631115052)；青岛农业大学大学生创新立项项目的资助。

参考文献

[1] Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions[J]. Microbiology Reviews, 1996, 60(3): 483-498.

[2] Yu H, Hausinger R, Tang H, et al. Mechanism of the 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine 3-monooxygenase flavoprotein from *Pseudomonas putida* S16[J]. Journal of Biological Chemistry. 2014(289): 29158–29170.

[3] Yao Y, Tang H, Ren H, et al. Iron(II)-dependent dioxygenase and *N*-formylamide deformylase catalyze the reactions from 5-hydroxy-2-pyridone to maleamate[J]. Scientific Report. 2013(3): 3235.

[4] Semenaite R, Gasparaviciute R, Duran R, et al. Genetic diversity of 2-hydroxypyridine-degrading soil bacteria[J]. Biologija, 2003, 2: 27-30.

[5] Sun JQ, Xu L, Tang YQ, et al. Bacterial pyridine hydroxylation is ubiquitous in environment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1):455-64

[6] Kolenbrander PE, Lotong N, Ensign JC. Growth and pigment production by *Arthrobacter pyridinolis* n. sp[J]. Archives of Microbiology, 1976, 110: 239-245.

[7] Kolenbrander PE, Weinberger M. 2-Hydroxypyridine metabolism and pigment formation in three *Arthrobacter* species[J]. Journal of Bacteriology, 1977, 132(1): 51-59.

[8] Vaitekunas J, Gasparaviciute R, Rutkiene R, et al. A 2-hydroxypyridine catabolism pathway in *Rhodococus rhodochrous* strain PY11[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(4): 1264-1273.

[9] Cain RB, Houghton C, Wright KA. Microbial metabolism of the puridine ring. Metabolism of 2- and 3-hydroxypyridines by the maleamate pathway in *Achromobacter* sp.[J]. Biochemical Journal, 1974, 140: 293-300.

[10] Shukla OP, Kaul SM. Microbiological transformation of pyridine N-oxide and pyridine by *Nocardia* sp.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1986, 32: 330-341.

[11] Knackmuss HJ, Beckmann W. The structure of nictine blue from *Arthrobacter oxidans*[J]. Arch. Mikrobiol, 1973, 90: 167-169.

[12] Kaiser JP, Feng Y, Bollag JM. Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions[J]. American Society for Microbiology, 1996, 60(3): 483-498.

[13] Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1988, 85: 2444-2448.

[14] Gabriel JP, Saucy F, Bersier LF. Paradoxes in the logisitic equation[J]. Ecological Modelling, 2005, 185(1):147-151.

[15] 宋健, 林建群, 金燕, 等. 以比生长速率时间曲线为基础的生物群体生长数学模型. 微生物学通报. 2007, 34(5):836-838.

Song J, Lin JQ, Jin Y, et al. A new population growth model based on the time dependent changes of the specific growth rate. Microbiology China. 2007, 34(5):836-838.

[16] Gasparaviciute R, Kropa A, Meskys R. A new *Arthrobacter* strain utilizing 4-hydroxypyridine[J]. Biologija, 2006, 4: 41-45.